







Method for the in vitro diagnosis of endometriosis

Patent number: EP1191107
Publication date: 2002-03-27
Inventor: HESS-STUMPP HOLGER DR (DE); HAENDLER BERNARD DR (DE); KRAETZSCHMAR JOERN DR (DE); KREFT BERTHOLT DR (DE); WINTERHAGER ELKE PROF DR (DE); REGIDOR PEDRO PD DR (DE); SCOTTI SIMONE DR (DE)
Applicant: SCHERING AG (DE)
Classification:
- **international:** C12Q1/68; G01N33/53
- **european:** C12Q1/68A6; C12Q1/68B10A; C12Q1/68M6; G01N33/68V
Application number: EP20010250300 20010821
Priority number(s): DE20001048633 20000925

Also published as:

 JP2002325600 (A)
 EP1191107 (A3)
 DE10048633 (A1)

Cited documents:

 WO9513821
 US6033860
 WO9935293
 XP002193575

Abstract of EP1191107

In vitro diagnosis of endometriosis by determining the amount of gene product (I) from at least one specific gene (II) in a patient sample and comparing this with the amount of (I) in a control sample. A reduced level of (I) is indicative of endometriosis. (I) is a product of the fibronectin; insulin-like growth factor binding protein-2; transmembrane receptor PTK7; platelet-derived growth factor receptor alpha ; collagen type XVIII alpha 1; subtilisin-like protein (PACE4); laminin M chain (merosin); elastin; collagen type IV alpha 2; p27 interferon alpha -inducible; reticulocalbin; aldehyde dehydrogenase 6; gravin; nodogen or phospholipase C epsilon genes. Independent claims are also included for the following: (1) use of antibodies against proteins, or parts of them, encoded by (II) for diagnosis of endometriosis; and (2) a DNA chip that has bound to it at least one oligonucleotide that comprises a partial sequence of the specified genes, or their complements.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 191 107 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
27.03.2002 Patentblatt 2002/13

(51) Int Cl.7: **C12Q 1/68, G01N 33/53**

(21) Anmeldenummer: **01250300.9**

(22) Anmeldetag: **21.08.2001**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: **25.09.2000 DE 10048633**

(71) Anmelder: **Schering Aktiengesellschaft
13353 Berlin (DE)**

(72) Erfinder:
• **Hess-Stumpp, Holger, Dr.
13505 Berlin (DE)**

- **Haendler, Bernard, Dr.
13465 Berlin (DE)**
- **Krätschmar, Jörn, Dr.
13409 Berlin (DE)**
- **Kreft, Bertholt, Dr.
13158 Berlin (DE)**
- **Winterhager, Elke, Prof.Dr.
45259 Essen (DE)**
- **Regidor, Pedro, PD Dr.
45133 Essen (DE)**
- **Scotti, Simone, Dr.
45529 Hattingen (DE)**

(54) **Methode zur in vitro Diagnostik von Endometriose**

(57) Die Erfindung betrifft eine Methode zur Diagnose von Endometriose wobei die Menge an Genprodukt von mindestens einem Gen aus der Gruppe bestehend aus Fibronectin, Insulin-like growth factor binding protein-2, Transmembrane receptor PTK7, Platelet-derived growth factor receptor alpha, Collagen type XVIII alpha

1, Subtilisin-like protein (PACE4), Laminin M chain (Merostin), Elastin, Collagen type IV alpha 2, p27 interferon alpha-inducible gene, Reticulocalbin, Aldehyde Dehydrogenase 6, Gravin, Nidogen und Phospholipase C Epsilon in einer Patientinnenprobe bestimmt wird.

EP 1 191 107 A2

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Methode zur in vitro Diagnostik von Endometriose.

[0002] Endometriose ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen, von der schätzungsweise 5-10% aller Frauen im reproduktionsfähigen Alter betroffen sind (Sillem, M. 1998; Programmed® 23, Suppl. 1, 1-28). Sie ist gekennzeichnet durch das Vorkommen von Endometriumsgewebe außerhalb der physiologischen Schleimhautauskleidung des Uterus. Neben Schmerzen und zahlreichen anderen Symptomen sind viele Endometriosepatientinnen steril, und ein großer Teil der IVF-Patientinnen (IVF - in vitro Fertilisation) leidet an Endometriose (Adamson, G.D. 1997; Sem. Reprod. Biol. 15, 263-271). In jüngster Zeit mehrten sich Publikationen, die für eine genetische Prädisposition bei der Entwicklung einer Endometriose sprechen (Kennedy, S. 1997; Sem. Reprod. Biol. 15, 309-318). So wurde der Verlust von Tumorsuppressormolekülen sowie familiäre Häufungen bei Endometriosepatientinnen beschrieben.

[0003] Zur Zeit wird die Endometriose mit Hilfe der Laparoskopie diagnostiziert. Dies ist eine invasive Methode, die häufig zu Komplikationen führt (Chapron C. et al. 1998; Hum. Reprod. 13, 867-872; Jansen F. W. et al. 1997; Br. J. Obstet. Gynecol. 104, 595-600). Sie wird unter Narkose durchgeführt und setzt einen voll eingerichteten Operationssaal voraus.

[0004] Daher besteht ein Bedarf an neuen Diagnostikmethoden. Wünschenswert wäre eine Methode, die für die Patientinnen weniger belastend wäre und die vom behandelnden Arzt durchgeführt werden könnte.

[0005] Dieses Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch die Identifizierung von bei der Endometriose differenziell regulierten Genen und die Bereitstellung einer Methode zur Detektion ihrer Genprodukte.

[0006] Die Erfindung betrifft eine Methode zur in vitro Diagnose von Endometriose wobei die Menge an Genprodukt von mindestens einem Gen aus der Gruppe bestehend aus Fibronectin, Insulin-like growth factor binding protein-2, Transmembrane receptor PTK7, Platelet-derived growth factor receptor alpha, Collagen type XVIII alpha 1, Subtilisin-like protein (PACE4), Laminin M chain (Merosin), Elastin, Collagen type IV alpha 2, p27 interferon alpha-inducible gene, Reticulocalbin, Aldehyde Dehydrogenase 6, Gravin, Nidogen und Phospholipase C Epsilon in einer Patientinnenprobe bestimmt wird und mit der Menge an diesem Genprodukt in einer Kontrollprobe verglichen wird, wobei eine geringere Menge an diesem Genprodukt auf das Vorliegen einer Endometriose hinweist.

[0007] Die Gruppe der Gene wird in Abbildung 1 näher beschrieben. Die Expressionsstärke, d.h. die Menge des Genproduktes von mindestens einem der in Abbildung 1 genannten Gene in einer Patientinnenprobe wird bestimmt und mit der aus einer Kontrollprobe (Frau ohne Endometriose) verglichen. Die zu vergleichenden

Proben müssen beide aus der sekretorischen Phase, also aus dem Bereich Tag 15-28 nach der letzten Menstruation stammen. Eine verminderte Expressionsstärke von mindestens einem der o.g. Gene in der Patientinnenprobe deutet auf das Vorliegen einer Endometriose hin.

[0008] Eine Patientinnenprobe kann eine Probe vom Endometriumgewebe, Peritonealflüssigkeit, Blut, vaginales Sekret oder Urin der Patientin sein.

[0009] Ein Genprodukt ist entweder mRNA, die daraus abgeleitete cDNA, ein Polypeptid oder Teile eines Polypeptids. Die Aminosäuresequenzen der Polypeptide sind in Abbildung 2 dargestellt.

[0010] Die erfindungsgemäße Methode kann zur erstmaligen Diagnose von Endometriose eingesetzt werden. In diesem Fall wird die Menge des Genproduktes in der Patientinnenprobe mit einer Kontrollprobe von nicht erkrankten Frauen verglichen. Die erfindungsgemäße Methode kann auch zur Beurteilung des Verlaufs der Krankheit verwendet werden. So kann z.B. der Erfolg einer Therapie bestimmt werden. In diesem Fall wird die Patientinnenprobe mit einer älteren Probe derselben Patientin verglichen.

[0011] Das Genprodukt Polypeptid oder ein Teilstück eines Polypeptids wird durch Immunassays detektiert. Dazu werden spezifische Antikörper gegen eines oder mehrere Polypeptide ausgewählt aus der in Abbildung 2 beschriebenen Gruppe, hergestellt. Die Antikörper können monoklonal oder polyklonal sein. Sie können gegen jeweils das gesamte Polypeptid oder gegen Fragmente davon gerichtet sein. Die Gewinnung eines solchen Antikörpers erfolgt nach Standardmethoden durch Immunisierung von Versuchstieren. Die Antikörper werden dann z.B. in einem ELISA (enzyme-linked-immunosorbent assay), in einem RIA (radioimmunoassay) oder in der Immunhistochemie zur Bestimmung der Menge des Genproduktes verwendet (Aoki, K. et al. 1996; Forensic Sci. Int. 80, 163-173).

[0012] Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines erfindungsgemäßen Antikörper-Chips zur Diagnose von Endometriose. Antikörper-Chips sind miniaturisierte Träger, meist aus Glas oder Silizium, auf deren Oberfläche Antikörper bekannter Spezifität in einem geordneten Raster in hoher Dichte immobilisiert werden. Die Detektion der Protein/Protein Interaktionen kann durch Massenspektrometrie, Fluoreszenz oder surface plasmon resonance erfolgen. Es können Antikörper, welche die aus der in Abbildung 2 beschriebenen Gruppe ausgewählten Proteine spezifisch binden, auf dem Antikörper-Chip immobilisiert sein. Methoden zur Herstellung und Verwendung von Antikörper-Chips sind in Kreider BL, Med Res Rev 2000,20:212-215 beschrieben.

[0013] Die Genprodukte mRNA bzw. die daraus abgeleitete cDNA können durch Hybridisierung mit Oligonukleotiden, z.B. durch einen Northern blot bestimmt werden. Diese Oligonukleotide haben Sequenzen, die komplementär zu Teilsequenzen des zu detektierenden

Genprodukts sind, und können z.B. mit einer chromogenen, radioaktiven oder fluoreszierenden Gruppe markiert sein. Vor der Hybridisierung kann die cDNA mit Hilfe der PCR amplifiziert werden (Sambrook, J. et al. 1989; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[0014] Die Genprodukte mRNA bzw. die daraus abgeleitete cDNA können auch durch quantitative PCR (polymerase chain reaction) bestimmt werden.

[0015] Die mRNA kann auch durch *in situ* Hybridisierung mit antisense-RNA bestimmt werden. Dabei kann die antisense-RNA mit Dioxigenin, ³²P oder ³³P markiert sein. Antisense Nukleinsäure ist eine DNA und/oder RNA, die komplementär zu einer mRNA ist. Sie kann die gesamte komplementäre Sequenz oder Teilsequenzen umfassen. Diese Methode ist dem Fachmann bekannt (Bartoli, S. et al. 1999; Histol. Histopathol. 14, 1231-1240).

[0016] Die Hybridisierung kann auch mit Hilfe eines DNA-Chips erfolgen. Die Erfindung betrifft daher weiterhin einen DNA - Chip, auf dem mindestens ein Oligonukleotid immobilisiert ist, das der vollständigen cDNA-Sequenz oder einer Teilsequenz bzw. komplementären Sequenz eines Gens ausgewählt aus der Gruppe, die in Abbildung 1 beschrieben ist, entspricht. Die Erfindung betrifft somit ferner die Verwendung eines erfindungsgemäßen DNA-Chips zur Diagnose von Endometriose.

[0017] DNA-Chips, auch als DNA-Mikroarrays bekannt, sind miniaturisierte Träger, meist aus Glas oder Silizium, auf deren Oberfläche DNA-Moleküle bekannter Sequenz in einem geordneten Raster in hoher Dichte immobilisiert werden. Die Oberflächengebundenen DNA-Moleküle werden mit komplementären, eventuell markierten Nukleinsäuren hybridisiert. Die Markierung kann ein Fluoreszenzfarbstoff sein.

[0018] Bei Oligonukleotid-Chips stellen die Oligonukleotide, die auf einem erfindungsgemäßen DNA-Chip gebunden sein können, Teilsequenzen der Genprodukte (mRNA bzw. daraus abgeleitete cDNA) in der Sense- oder Antisense-Richtung dar. Es können ein oder mehrere Oligonukleotide pro Gen auf dem DNA-Chip gebunden sein. Bevorzugt sind 25 Nukleotid-lange Oligonukleotide, die aus dem nicht kodierenden Strang abgeleitet sind. Diese werden bevorzugt aus dem jeweiligen 3'untranslatierten Ende des Gens ausgewählt. Zur Detektion können Oligonukleotide von einem Gen, mehreren Genen oder allen Genen ausgewählt aus der in Abbildung 1 beschriebenen Gruppe eingesetzt werden. Methoden zur Herstellung und Verwendung von DNA-Chips sind z.B. in den US-Patenten Nr. 5,578,832; 5,556,752 und 5,510,270 beschrieben.

[0019] Bei cDNA Chips sind die vollständigen Genprodukte (cDNAs) oder Subfragmente (200-500bp lang) auf dem Chip gebunden. Die Methode wird z. B. in Eckmann, L. et al., J Biol Chem 2000, 275: 14084-14094 beschrieben.

[0020] Das Genprodukt mRNA kann auch durch chromogene Assays bestimmt werden.

Beschreibung der Abbildungen

[0021] Abb. 1 zeigt die Liste der Gene, die in der sekretorischen Phase bei Vorliegen einer Endometriose herunterreguliert sein können und damit für eine Diagnostik der Endometriose verwendet werden können. In Spalte 1 sind die Namen und die Datenbank-Nummer (Accession Numbers) der Gene aufgelistet, die bei der Analyse als differentiell reguliert gefunden wurden. In Spalte 2 findet sich der Vergleich von Proben aus der sekretorischen Phase (sekr. Phase), jeweils *Endometriose* versus *Normal* (keine Endometriose); *down* bezeichnet den Zustand der Herunterregulation. Die erste Zahl in Klammern gibt an, wie oft das Gen als heraufreguliert und die zweite Zahl gibt an, wie oft das Gen als herunterreguliert gefunden wurde. Für diese Analyse wurden 20 Einzelvergleiche durchgeführt. In Spalte 3 findet sich der Vergleich von Proben aus der proliferativen Phase (prol. Phase). Für diese Analyse wurden 30 Einzelvergleiche durchgeführt. Die Bezeichnung *down* beschreibt den gleichen Zustand wie in Spalte 1, *nc* bedeutet *no correlation* (keine Korrelation), d.h. man findet dieses Gen sowohl herunter- als auch heraufreguliert. Die Bedeutung der Zahlen ist analog zu Spalte 2. In der vierten Spalte findet sich der Vergleich von Proben aus der sekretorischen Phase mit Proben aus der proliferativen Phase. Hier wurde Endometrium von Frauen ohne Endometriose miteinander verglichen. Für diese Analyse wurden 25 Einzelvergleiche durchgeführt. Die Bezeichnung *up* beschreibt den Zustand der Heraufregulation. Die Bedeutung der Zahlen ist analog zu Spalte 2.

[0022] Abbildung 2 zeigt eine Liste der Polypeptide, die von den in Abbildung 1 dargestellten Genen kodiert werden und bei Vorliegen einer Endometriose vermindert exprimiert werden.

Beispiele

[0023] Die in den Beispielen verwendeten molekularbiologischen Methoden wie z.B. Isolierung von RNA, Sequenzierung von DNA, RNase Protection, Northern Blot Analyse, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden nach Standardprotokollen, wie in bekannten Lehrbüchern wie z.B. in Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, J. et al. 1989; Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben, durchgeführt. Methoden für Subtraktionsanalysen der Genexpression sind z.B. in Liang, P. und Pardee, A. B. 1995; Curr. Opin. Immunol. 7, 274-280 beschrieben.

Beispiel 1: Identifizierung von Endometriose-assoziierten Genen

[0024] Gene, die mit dem Krankheitsbild der Endometriose assoziiert sind, wurden durch Vergleich von Endometriumproben folgender Patientinnengruppen identifiziert:

1. Proliferative Phase: Tage 4-14 nach der letzten Menstruation. Diese Gruppe setzte sich aus Patientinnen zusammen, bei denen aufgrund von Leiomyomen eine Hysteroskopie oder Hysterektomie durchgeführt wurde.

2. Sekretorische Phase: Tage 15-28 nach der letzten Menstruation. Diese Gruppe setzte sich aus Patientinnen zusammen, wie unter 1. beschrieben.

3. Proliferative Phase plus Endometriose: Tage 4-14 nach der letzten Menstruation. Die Patientinnen dieser Gruppe litten an Endometriose.

4. Sekretorische Phase plus Endometriose: Tage 15-28 nach der letzten Menstruation. Die Patientinnen dieser Gruppe litten an Endometriose.

[0025] Endometrium von Frauen mit Endometriose wurde mittels einer Strichcurettage gewonnen. Das Endometrium der Vergleichsgruppe wurde von Frauen im Rahmen einer Hysteroskopie oder einer Hysterektomie, die wegen eines Leiomyoms vorgenommen wurde, gewonnen. Das Gewebe wurde nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurde Gesamt-RNA aus den Proben extrahiert. Diese RNA wurde amplifiziert, durch einen Fluoreszenzmarker markiert, und mit einem DNA-Chip (Human SL array der Firma Affymetrix, enthaltend Oligonukleotide für ca. 7000 humane Gene) hybridisiert. Nach dem Hybridisierungsverfahren wurde der DNA-Chip in einem Scanner analysiert. Die Hybridisierungsmuster aller Gensequenzen, die sich auf dem Chip befinden, wurden zwischen allen Proben verglichen. Insgesamt wurden 20 Einzelvergleiche mit Proben aus der sekretorischen Phase und 30 Einzelvergleiche mit Proben aus der proliferativen Phase durchgeführt bei denen jeweils eine Probe von einer Frau mit Endometriose stammte und eine Probe von einer Frau, die nicht an Endometriose litt.

[0026] Als differentiell reguliert betrachtet wurden alle diejenigen Gene, die in mindestens der Hälfte der Fälle (10 Vergleiche) um mindestens den Faktor 1.5 gegenüber der Kontrollgruppe (Proben von Frauen ohne Endometriose) herauf- oder herunterreguliert waren. Außerdem wurden 25 Einzelvergleiche von Proben aus der sekretorischen Phase mit Proben aus der proliferativen Phase durchgeführt. Hier wurde Endometrium von Frauen ohne Endometriose verglichen.

[0027] Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt. Die aufgelisteten Gene können als Differenzierungsmarker betrachtet werden. Ausgehend von der Betrachtung, daß die proliferative Phase, dem Namen entsprechend von proliferativen Prozessen dominiert wird, wird die sekretorische Phase eher als Differenzierungsphase angesehen. Vor diesem Hintergrund sollten Gene, die für die Differenzierung von Bedeutung sind, während dieser Phase heraufreguliert werden (vergleiche mit Abbildung 1, Spalte 4) und während der proliferati-

ven Phase herunterreguliert oder gleichbleibend reguliert sein (vergleiche mit Abbildung 1, Spalte 3). Die Gene, die in Spalte 1 aufgelistet sind, erfüllen diese Kriterien und werden daher als Differenzierungsmarker bezeichnet. Dass diese Gene bei Frauen mit Endometriose herunterreguliert sind (Spalte 2), deutet auf eine gestörte Differenzierung in der sekretorischen Phase hin.

Beispiel 2: Diagnostik von Endometriose

1. Probengewinnung

[0028] Für die DNA-Chip-Analyse wird Endometriumgewebe aus Patientinnen gewonnen und Gesamt-RNA daraus isoliert. Die RNA wird dann amplifiziert und an einen Fluoreszenzmarker gekoppelt. Für den Immuntest kann Peritonealflüssigkeit, Blut, Vaginal-Sekret, Urin oder Endometriumgewebe von der Patientin gewonnen werden.

2. Detektion der Genprodukte

2a. mit Hilfe eines DNA-Chips

[0029] Zuerst werden die geeigneten DNA-Sequenzen aus den Genen, die aus der in Abbildung 1 beschriebenen Gruppe ausgewählt werden, bestimmt. Geeignet sind Sequenzen, die mit den ausgewählten Gentranskripten hybridisieren können. Die Oligonukleotide werden dann durch einen chemischen Prozess, der auf photolithographischen Verfahren basiert, auf dem Chip hergestellt. Dazu werden photolithographische Masken verwendet, die durch geeignete Computer-Algorithmen erzeugt wurden.

[0030] Die markierte RNA wird mit dem Chip in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Anschließend wird der Chip in einem Scanner analysiert, der die Hybridisierungsprofile bestimmt. Dadurch kann festgestellt werden, ob in der sekretorischen Phase eines oder mehrere der Gene der in Abbildung 1 aufgelisteten Gene herunterreguliert ist, was auf eine Endometriose hinweist.

2b. durch Immuntest

[0031] Für die Durchführung eines Immuntestes benötigt man spezifische Antikörper, die an die in Abbildung 2 beschriebenen Polypeptide binden. Die Antikörper können mono- oder polyklonale Antikörper sein, die gegen die aufgereinigten Proteine, Peptide, ausgewählt aus den kodierten Proteinen, oder rekombinant hergestellte Fragmente oder Gesamtprotein gerichtet sind.

[0032] Erfolgt die Analyse mittels Immunohistochemie verwendet man Endometrium, das der zu analysierenden Patientin entnommen wurde. Nach geeigneter Fixierung des Gewebes, z.B. mittels Formaldehyd und anschließender Einbettung in Paraffin kann das Gewebe für die immunhistochemische Analyse verwendet werden. Dazu werden von dem fixierten und eingebet-

teten Gewebe mit einem Mikrotom Schnitte geeigneter Dicke, z.B. 4 µm, angefertigt. Der oder die spezifischen Antikörper werden dann mit den weiter vorbereiteten Gewebeschnitten (z.B. Deparaffinierung, Blocken) eine Zeitlang unter geeigneten Temperaturbedingungen, z.B. 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschschr

itten mit einer geeigneten Lösung, z.B. PBS, werden die Schnitte in einem 2. Schritt mit einem geeigneten zweiten Antikörper inkubiert, der für die nachfolgenden Reaktionen, z.B. biotiniliert ist. Der 2. Antikörper bindet an die für die jeweilige Spezies konstante Region des 1. Antikörpers. Nach geeigneter Inkubationszeit und Waschschr

itten wird nun in einem dritten Schritt die Gewebeprobe z.B. mit Horse-Redish Peroxidase, gekoppelt an Streptavidin, inkubiert. Nach geeigneter Inkubationszeit und Waschschr

itten wird nun in einem letzten Schritt durch Zugabe eines geeigneten Farbstoffs, z.B. DAB, von der Peroxidase eine Enzymreaktion katalysiert, die zu einer Farbreaktion dort führt, wo der 1. Antikörper spezifisch gebunden hat. Nach Abstoppen der Enzymreaktion und Waschschr

itten kann der Gewebeschnitt nun getrocknet, fixiert und mit einem Deckgläschen versehen, unter dem Mikroskop analysiert werden. Um zu entscheiden, ob in der Gewebeprobe ein quantitativer oder auch qualitativer Unterschied besteht, muß eine entsprechende Kontrolle einer Probe von einer Frau ohne Endometriose als Vergleich herangezogen werden.

[0033] Erfolgt die Analyse mittels Westernblot werden die gewonnenen Gewebeproben oder Extrakte aus der Peritonealflüssigkeit, Blut, Vaginal-Sekret oder Urin mittels einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Auftrennung werden die in dem Gel aufgetrennten Polypeptide durch Anlegen eines elektrischen Stroms auf eine geeignete Trägermembran, z.B. Nitrozellulose, überführt. Die auf der Trägermembran fixierten Proteine werden nun in einem 1. Schritt mit dem oder den spezifischen Antikörpern inkubiert. Nach geeigneten Waschvorgängen, z.B. mit TBS/TBST, wird die Trägermembran in einem 2. Schritt mit einem 2. Antikörper inkubiert, der an die für die jeweilige Spezies konstante Region des 1. Antikörpers bindet. Der 2. Antikörper kann eine radioaktive Markierung tragen oder ein gekoppeltes Enzym, z.B. alkalische Phosphatase, die in einer nachfolgenden Farbreaktion ein farbloses Substrat in ein farbiges Substrat umwandelt. Da die Menge des an dem Antigen gebundenen des 2. Antikörpers derjenigen des Antigens proportional ist, kann daher die Menge des gemessenen Farbstoffs für eine quantitative Analyse des oder der in dem Extrakt vorhandenen Polypeptide genutzt werden.

[0034] Erfolgt die Analyse mittels eines Festphasenimmunoassays wird der oder die spezifischen Antikörper an eine polymere Trägermatrix, z.B. Polyvinylchlorid, gebunden. Anschließend inkubiert man den oder die fixierten Antikörper mit dem Extrakt, der aus z.B. aus der Peritonealflüssigkeit, Blut, Vaginal-Sekret oder Urin gewonnen wurde. Nach geeigneten Wasch-

vorgängen wird in einem 2. Schritt ein 2. Antikörper hinzugegeben, der an einer anderen Stelle des zu detektierenden Antigens spezifisch bindet. Der 2. Antikörper trägt z.B. eine radioaktive oder Fluoreszenzmarkierung und kann daher in einem 3. Schritt hochempfindlich nachgewiesen werden. Die an dem Antigen gebundene Menge des 2. Antikörpers ist derjenigen des Antigens proportional und kann daher für eine quantitative Analyse des oder der in dem Extrakt vorhandenen Proteine genutzt werden.

[0035] Erfolgt die Analyse mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) wird der oder die spezifischen Antikörper an eine polymere Trägermatrix, z.B. Polyvinylchlorid, gebunden. Anschließend inkubiert man den oder die fixierten Antikörper mit dem Extrakt, der aus z.B. aus der Peritonealflüssigkeit, Blut, Vaginal-Sekret oder Urin gewonnen wurde. Nach geeigneten Waschvorgängen wird in einem 2. Schritt ein 2. Antikörper hinzugegeben, der an einer anderen Stelle des zu detektierenden Antigens spezifisch bindet. Der 2. Antikörper trägt zusätzlich noch ein gekoppeltes Enzym, z.B. eine alkalische Phosphatase. Dieses Enzym katalysiert nun in einem nachfolgenden Schritt die Umwandlung eines farblosen Substrats in ein farbiges Produkt. Es kann aber auch ein nicht-fluoreszierendes Substrat in ein fluoreszierendes Substrat umgewandelt werden. Die Menge des farbigen oder fluoreszierenden Produkts kann kolorimetrisch gemessen werden. Da die Menge des an dem Antigen gebundenen 2. Antikörpers derjenigen des Antigens proportional ist, kann daher die Menge des gemessenen Farbstoffs oder Fluoreszenzproduktes für eine quantitative Analyse des oder der in dem Extrakt vorhandenen Polypeptide genutzt werden.

Patentansprüche

1. Methode zur in vitro Diagnose von Endometriose, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Menge an Genprodukt von mindestens einem Gen aus der Gruppe bestehend aus Fibronectin, Insulin-like growth factor binding protein-2, Transmembrane receptor PTK7, Platelet-derived growth factor receptor alpha, Collagen type XVIII alpha 1, Subtilisin-like protein (PACE4), Laminin M chain (Merosin), Elastin, Collagen type IV alpha 2, p27 interferon alpha-inducible gene, Reticulocalbin, Aldehyde Dehydrogenase 6, Gravin, Nidogen und Phospholipase C Epsilon in einer Patientinnenprobe bestimmt wird und mit der Menge an diesem Genprodukt in einer Kontrollprobe verglichen wird, wobei eine geringere Menge an diesem Genprodukt auf das Vorliegen einer Endometriose hinweist.
2. Verwendung von Antikörpern gegen ein oder mehrere Proteine kodiert von Genen aus der Gruppe bestehend aus Fibronectin, Insulin-like growth factor binding protein-2, Transmembrane receptor

PTK7, Platelet-derived growth factor receptor alpha, Collagen type XVIII alpha 1, Subtilisin-like protein (PACE4), Laminin M chain (Merosin), Elastin, Collagen type IV alpha 2, p27 interferon alpha-inducible gene, Reticulocalbin, Aldehyde Dehydrogenase 6, Gravin, Nidogen und Phospholipase C Epsilon oder gegen Teile des Polypeptids oder der Proteine zur Diagnose von Endometriose. 5

3. DNA - Chip, **dadurch gekennzeichnet, daß** auf dem Chip mindestens ein Oligonukleotid, das eine Teilsequenz einer DNA ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Fibronectin, Insulin-like growth factor binding protein-2, Transmembrane receptor PTK7, Platelet-derived growth factor receptor alpha, Collagen type XVIII alpha 1, Subtilisin-like protein (PACE4), Laminin M chain (Merosin), Elastin, Collagen type IV alpha 2, p27 interferon alpha-inducible gene, Reticulocalbin, Aldehyde Dehydrogenase 6, Gravin, Nidogen und Phospholipase C Epsilon oder deren komplementären Sequenz umfaßt, gebunden ist. 10 15 20
4. Verwendung eines DNA-Chips nach Anspruch 3 zur Diagnose von Endometriose. 25

30

35

40

45

50

55

Datenbank-Nr., Name	Vergleich Endometriose Versus Normal (sek. Phase)	Vergleich Endometriose Versus Normal (prol. Phase)	Vergleich sek. versus prol. Phase (Endometrium)
X02761, fibronectin (FN precursor)	down (0 up - 16 down)	down (4 up - 12 down)	up (18 up - 1 down)
S37730, insulin-like growth factor binding protein-2	down (1-15)	nc (13-13)	up (17-2)
U40271, Human transmembrane receptor precursor (PTK7)	down (0-14)	nc (6-2)	up (9-1)
M21574, platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA)	down (0-13)	nc (8-10)	up (17-0)
L22548, collagen type XVIII alpha 1 (COL18A1)	down (0-13)	down (0-8)	up (17-0)
M80482, subtilisin-like protein (PACE4)	down (1-13)	down (4-13)	up (22-2)
Z26653, laminin M chain (merosin)	down (1-13)	nc (9-10)	up (17-1)
M36860, U77846, Elastin	down (0-12)	nc (0-0)	up (25-0)
X05610, type IV collagen alpha -2 chain	down (0-12)	nc (3-3)	up (11-0)
X67325, p27 interferon alpha-inducible gene	down (1-12)	nc (9-10)	up (10-2)

Abbildung 1

Datenbank-Nr., Name	Vergleich Endometriose versus Normal (sekr. Phase)	Vergleich Endometriose versus Normal (prol. Phase)	Vergleich sekr. versus prol. Phase (Endometrium)
D42073, reticulocalbin	down (0-11)	nc (8-5)	up (11-2)
U07919, aldehyde dehydrogenase 6	down (1-11)	nc (13-9)	up (22-0)
U81607, gravin	down (1-11)	nc (8-7)	up (18-1)
M30269, nidogen	down (0-10)	nc (8-14)	up (15-3)
D42108, phospholipase C Epsilon	down (1-10)	nc (12-14)	up (25-0)

Abbildung 1

Abbildung 2

Seq.IDNO	Name	Proteinsequenz
1	Fibronektin	MLRGGPGLL LLAQCILGTA VPSTGASKSK RQAQMVPQ SPVAVSQSKP GCYDNGKHQ INQWERTYL GNALVCTCYG GSRGFNCESK PEAEETCFDK YTGNTYRVGD TYERPKDSMI WDCTCIGAGR GRISCTIANR CHEGGQSYKI GDTWRRPHET GGYMLECVCL GNGKGWTCCK PLAEKCFDHA AGTSYVVGET WEKPYQGMM VDCTCLGEGS GRITCTSRNR CNDQDTRTSY RIGDWTSSKD NRGNLQCCIC TGNGRGWKC ERHTSVQTTT SGSGPFDDVR AAVYQPOPHP QPPPYGHCVT DSGVVYSVGM QWLKTQGNKQ MLCTCLNGV SCQETAVTQT YGGNSNGEPC VLPFTYNGRT FYSCITEGRQ DGHLMCSTTS NYEQDQKYSF CTDHTVLVQT QGGSNGALC HFPFLYNNHN YTDCTSEGRR DNKWCCTTQ NYDADQKFGF CPMAAHEEIC TTNEGVMYRI GDQWDKQHDH GHMRCCTCVG NRGGEWTCIA YSQLRDQCIY DDITYNVNDT FHKRHEEGHM LNCTCFGGR GRWKCDPVDQ CQDSETGTFY QIGDSWEKYV HGVRYQCYCY GRGIGEWHCQ PLQTYPSSSG PVEVFITETP SQPNSHPIQW NAPQPSHISK YILRWRPKNS VGRWKEATIP GHLSYTIKG LKPGVVYEQQ LISIQQYCHQ EVTRDFTTT STSTPVTSTNT VTGETTPFSP LVATSESVTE ITASSFVVSF VSASDTVSGF RVEYELSEEG DEPOYLDLPS TATSVNIPDL LPGRKYIVNV YQISEDGEQS LILSTSQTTA PDAPPDPTVD QVDDTSIVVR WSRQAPITG YRIVYSPSVE GSSTELNLP TANSVTLSDL QPGVQYNIIT YAVEENQEST PVVIQETTQ TPRSPTVPSP RDLQFVEVTD VKVTIMWTPP ESAVTGYRVD VIPVNLPGH GQRLPISRNT FAEVTGLSPG VTYFVKVFAV SHGRESKPLT AQOTTKLDAP TNLQFVNETD STVLVRWTPP RAQITGYRLT VGLTRRQQR QYNVGPVSVK YPLRNLPAS EYTVSLVAIK GNOESPATG VFTTLQPGSS IPPYNTTEVE TTIVITWTPA PRIGFKLGVR PSQGEAPRE VTSDSGSIVV SGLTPGVEYV YTIQVLRDQ ERDAPIVNKV VTPLSPPTNL HLEANPDGTG LTVSWERST PDITGYRIIT TPTNGQQGNS LEEVHADQS SCTFDNLSPG LEYNVSVTV KODKESVPIS DTIIPAVPPP TDLRFTNIGP DTMRTWAPP PSIDLTNFLV RYSPVKNEED VAELSISPSD NAVLTNLLP GTEYVSVSS VYEQHESTPL RGRQKTGLDS PTGIDFSDIT ANSFTHWIA PRATITGYRI RHHPEHFSGR PREDRVPHSR NSITLTNLTP GTEYVVSIVA LNGREESPLL IGQOSTVSDV PRDLEVVAA PTSLLSWDA

Abbildung 2

Seq.IDNO	Name	Proteinsequenz
		PAVTVRYRI TYGETGNSP VQEFVPGSK STATISGLKP GVDYITVYA VTGRGDSPAS SKPISINVRT EIDKPSQMOV TDVQNSISV KWLPS SSPVT GYRVTTTPKN GPGTKTKTA GPDQTEMTEIE GLOPTVEYVV SVY AQNPSGE SQPLVQTAVT NIDRPKGLAF TDVDVDSIKI AWESPOQVS RYRVTYSSPE DGIHELFPAP DGEEDTAELQ GLRPGSEYTV SVVALHDDME SQPLIGTOST AIPATDLKF TQVTPTSLSA QWTPPNVQLT GYRVRVTPKE KTGPMKEINL APDSSSVVVS GLMVATKYEY SVYALKDTLT SRPAQGVVTT LENVSPPRRA RVTDATETTI TISWRKTET ITGFQVDAVP ANGQTPIQRT IKPDVRSYTI TGLQPGTDYK IYLYTLNDNA RSSPVVIDAS TAIDAPSNLR FLATTNLSL VSWQPPRARI TGYIIKYEKP GSPPREVVPR PRPGVTEATI TGLEPGTEYT IYVIALKNQ KSEPLIGRKK TDELPQLVTL PHPNLHGPEI LDVESTVQKT PFVTHPGYDT GNGIQLPGTS GQPSVGGQM IFEEHGFRT TPPTTATPIR HRPRYPNNV GEEIQIGHIP REDVDYHLYP HGPGLNPNAS TQGEALSQTT ISWAPFQDTS EYIISCHPVG TDEEPLQFRV PGTSTSATLT GLTRGATYNI IVEALKDQQR HKVREEVTV GNSVNEGLNQ PTDDSCFDPY TVSHYAVGDE WERMSESGFK LLCQCLGFGS GHFRCDSRW CHDNGVNYKI GEKWDRQGEN GQMMSCCTLG NGKGEFKCDP HEATCYDDGK TYHVGEQWQK EYLGAICSCT CFGGQRGWRC DNCRRPGGEP SPEGTTGQSY NQYSORYHOR TNTNVNCPTE CFMPLDVQAD REDSRE
2	Insulin-like growth factor binding protein-2	MLPRVGC PAL PLPPPPLLPL LPLLLLLLGA SGGGGGARAE VLFRCPPTCTP ERLAACGPPP VAPPAVA AV AGGARMPCAE LVREPGCGCC SVCARLEGEA CGVYTPRCGQ GLRCYPHPGS ELPLQALVMG EGTCEKRRDA EYGASPEQVA DNGDDHSEGG LVENHVDSTM NMLGGGGSAG RKPLKSGMKE LAVFREKYTE QHRQMGKGGK HHLGLEEPKK LRPPPARTPC QOELDQVLER ISTMLPDER GPLEHLYSLH IPNCDKHGGLY NLKQCKMSLN GQGECCWVN PNTGKLIQGA PTIRGDPECH LFYNEQQEAR GVHTQRMQ

Abbildung 2

Seq.IDNO	Name	Proteinsequenz
3	Transmembrane receptor PTK7	MGAARGSPAR PRRLLLSVL LLPLGGTQT AIPIKQPSS QDALQRRAL LRCEVEAFGP VHVVWLLDGA PVQDTERRFA QGSSLSFAAV DPLQDSGTQ CVARDDVTGE EARSANASFN IKWIEAGPVV LKHPASEAEI QPQTQVKLRC HIDGHPRTY QWFRDGTPLS DGQSNHTVSS KERNLTLRPA GPEHSGLYSC CAHSAFSQAC SSQNFTLSIA DESFARVVLA PQDVVVVARYE EAMFHCQFSA QPPPSLQWLF EDETPTITNRS RPPHLRRATV FANGSLLLTQ VRPRNAGIYR CIGQGORGPP IILEATLHLA BIEDMPLFEP RVFTAGSEER VTCLPPKGLP EPSVWWEHAG VRLPTHGRVY QKGHELVLAN IAESDAGVYT CHAANLAGOR RODVNITVAT VPSWLKKPQD SQLEEGKPGY LDCLTQATPK PTVVWYRNQM LISEDSRFEV FKNGTLRINS VEYVDGTWYR CMSSTPAGSI EAQAVLQVLE KLKFTPPPEP QQCMGFDKEA TVPCSATGRE KPTIKWERAD GSSLPEWVTD NAGTLHFARV TRDDAGNYTC IASNGPQGOI RAHVQLTVAV FITFKVEPER TTVYQGHTAL LQCEAQGDPEK PLIQWKGKDR ILDPTKLGPR MHIFQNGSLV IHDVAPEDSG RYTICAGNSC NIKHTEAPLY VVDKVPPEES EGPSPPPYK MIQTIGLSVG AAVAYIIIAVL GLMFYCKKRC KAKRLQKQPE GEEPEMECLN GGPLONGQPS AEIQEEVALT SLGSGPAATN KKHSTSDKMV FPRSSIQPIT TLGKSEFGEV FLAKAQGLEE GVAETLLVK SLQSKDEQQQ LDFRRELEMF GKLNHANVVR LLGLCREAEP HVMVLEYVDL EDLKQFLRIS KSKDEKLKSQ PLSTKQKVAL CTQVALGMEH LSNRRFVHKD LAARNCLVSA QRQVKVSALG LSKDVYNSEY YHFRQAWVAL RWMSPPEALE GDFSTKSDVW ASGVLMWEVF THGEMPHGGQ ADDEVVLADLQ AGKARLPQPE GCPSKLYRLM QRCWALSPKD RPSFSEIASA LGDSTVDSPK
4	platelet-derived growth factor receptor alpha	MGTSHPAFLV LGCLLTGLSL ILCQLSLPSI LPNENEKVQV LNSSFSLRCF GESEVSWQYP MSEEESDVE IRNEENNSGL FVTVLEVSSA SAAHTGLYTC YNNHTQTEEN ELEGRHIYIY VPDPDVAFPV LGMTDVLVIV EDDDSAIIPC RTTDPETPTVT LHNSEGVVPA SYDSRQGFNG TFTVGPYICE ATVKGKKFOT IPFNVYALKA

Abbildung 2

Seq.IDNO	Name	Proteinsequenz
5	Collagen xVIII alpha 1 type	<p> TSELDEMEA LKTVYKSGET IVVTCVAFNN EVVDLQWTYP GEVKGKGITM LBEIKVPSIK LVYTLTVPEA TVKDSGDYEC AARQATREVK EMKKVTISVH EKGFEIKPT FSQLEAVNLH EVKHVVVEVR AYPPPRISWL KNNLTLIENL TEITTDVEKI QEIRYRSKLK LIRAKEEDSG HYTIVAQNEH AVKSYTFELL TQVPSSILDL VDDHHGSTGG QTVRCTAEGT PLPDIEWMIC KOIKKCNNET SWTILANNVS NIITEIHSRD RSTVEGRVTF AKVEETIAVR CLAKNLLGAE NRELKLVAPT LRSELTVAAL VLVLVIVII SLIVLVVIWK QKPRYEIRWR VIESISPDGH EYIYVDPMQL PYDSRWEFPR DGLVLGRVLG SGAFGKVVEG TAYGLSRQSP VMKVAVKMLK PTARSSKQA LMSELKIMTH LGPHLNIIVNL LGACTKSGPI YIITEYCFYG DLVNYLHKNR DSFLSHHPEK PKKELDIFGL NPADESTRSY VILSFENNGD YMDMKQADTT QYVPMLEKE VSKYSIDIORS LYDRPASYYK KSMLDSEVKN LLSDDNSEGL TLLDLLSFTY QVARGMEFLA SKNCVHRDLA ARNVLLAOGK IVKICDFGLA RDIIMHDSNVV SKGSTFLPVK WMAPEISFDN LYTTLSDVMS YGILLWEIFS LGGTPYPGMM VDSTFFYKIK SGYRMAKPDH ATSEVYEIMV KCWNSEPEK PSFYHLSEIV ENLLPGQYKK SYEKIHLDFL KSDHPAVARMVDSNDAYIG VTYKNEEDKL KDWEGLDEQ RLSADSGYII PLPDIDPVPE EEDLGKRNH SSQTSESAI ETGSSSSTFI KREDETIEDI DMDDDIGIDS SDLVEDSFL </p>
		<p> GEVGADGIPG FPGLPGREGI AGPQPKGDR GSRGEKGDPG KDGLGQPLP GPRGPPGPV YVSEQDGSVL SVPGPEGRRG FAGFPGPAGP KGNLGSKGEL GSPGPKGEK EPGSIFSPDG GALGPAQKGA KGEPGFRGPP GLYGRPGYKG EIGFPGRGRG PGMNGLKGEK GEPGDASLGF GMRGMPGPPG PPGPPGPGT PYDSNVFAE SSRPGPPGLP GNQGGPPGPKG PKGEVGPVPGP PGQFPDFDLQ KEAEMKGEK DRGDAGQKGE RGEPPGGGFF GSSLPAGPGA PGPRGYPGIP GKGESIRGQ PGPGPQGGP GIGYEGRQGP PGPPGPPGPP SFGPHRQTI SVPGPPGPPG PPGPPGTGMA SSGQVRLWAT RQAMLGQVHE VPEGWLIFVA EQEELYVRVQ NGFRKVQLEA RTPLPRGTDN EVAALQPPV QLHDSNPYPR REHPHTARP WRADDILASP PGLPEPQYP GPHHSSVH CGPARPTSPP AHSRDFQPV LHLVALNSPL SSGMRGIRGA DFQCFQARA VGLAGTFRAF LSSRLQDLYS </p>

Abbildung 2

Seq.IDNO	Name	Proteinsequenz
6	Subtilisin-like protein (PACE4)	IVRRADRAAV PIVNLKDELL FPSWEALFSG SEGPLKPGAR IFSFDGKDVLR RHPTWPQKSV WHGSDPNRR LTESYCETWR TEAPSATGQA SSLGGRLLG QSAASCHHAY IVLCIENSEM TASK MPPRAPAPG PRPPPRAAAA TDTAAGAGGA GGAGGAGGPG FRPLAPRPWR WLLLLALPAA CSAPPPRPVY TNHWAVQVLG GPAEADRVAA AHGYLNLGQI GNLEDYHYFY HSKTFKRSTL SSRGPHTFLR MDPQVKWLQQ QEVKRRVKRQ VRSDPQALYF NDPIWSNMWY LHCGDKNSRC RSENNVQAAW KRGYTGKNNV VTILDDGIER NHPDLAPNYD SYASYDVNGN DYDPSPRYDA SNEKHGTRC AGEVAASANN SYCIVGIAYN AKIGGIRMLD GDVTDVVEAK SLGIRPNYID IYSASWGPDD DGKTVDPGR LAKQAFEYGI KKGROGLGSI FWASNGNGR EGDYCSDGY TNSIYTISVS SATENGYKPM YLEECATLA TTYSSGAFYE RKIVTTDLRQ RCTDHTGTGS VSAPMVAGII ALALEANSQI TWRDVQHLV KTSRPAHLKA SDWKVNGAGH KVSHFYGFGL VDAEALVVEA KKWTAVPSQH MCVAASDKRP RSIPLVQVLR TTALTSACAE HSDQRVVYLE HVVVRTSISH PRGDLQIYL VSPSGTKSQL LAKRLDLLSN EGFTNWEFMT VHCWGEKAEG QWTLEIQDLP SQVRNPEKQG KLKEWSLILY GTAEHYHTF SAHQSRSRML ELSAPELEPP KAALSPSQVE VPDEEDYTA QSTPGSANIL QTSVCHPECG DKGCDGPNAD QCLNCVHFSL GSVKTSRKCV SVCPLGYFGD TAARRCRRCH KGCETCSSRA ATQCLSCRRG FYHHQEMNTC VTLCFAGFYA DESQKNCLKC HPSCKKCVDE PEKCTVCKEG FSLARGSCIP DCEPGTYFDS ELIRCGECHH TCGTCVGPGR EECIHCAKNF HFHDWKCVPA CGEGFYPEEM PGLPHKVCRR CDENCLSCAG SSRNC SRCKT GFTQLGTSCI TNHTCSNADE TFCMVKSNR LCERKLFIOF CCRTCLLAG MPGAAGVLLL LLLSGGLGV QAQRPPQQRQ SOAQOQGLF PAVNLASNA LITNATCGE KGPAMYCKLV EHVPGQVRN PQCRICNQNS SNPNQRHPIT NAIDGKNTW QSPSIKNGIE YHYVTITL DL QQVFQIAYVI VKAANSRPG NWILERSLDD VEYKWPQYHA VTDTECLTLY NIYRTGPPS YAKDDEVICT SFYSKIHPL NGEIHISLIN GRPSADDPSP ELLEFTSARY IRLRFQIRI LNADLMMFAH KDPREIDPIV TRYYYSVKD ISVGGWCICY GHARACPLDP ATNKSRCCE HNTCGSDCQ CCPGFHQKPW RAGTFLTKTE CEACNCHGKA
7	Laminin M chain (Merossin)	

Abbildung 2

Seq.IDNO	Name	Proteinsequenz
		EECYYDENVA RRNLNLNIRG KYIGGGVCIN CTQNTAGINC ETCTDGFRRP KGVSPNYPRP CQCHCDPIG SLNEVCVKDE KHARRGLAPG SCHCKTGFGG VSCDRACARG TYGPDCKACN CSGLGSKNED PCFGPCICKE NVEGGDCSRC KSGFFNLQED NWKGCEDECFC SGVSNRCQSS YWTYGKIQDM SGWYLTDLPG RIRVAPQQDD LDSPQOISIS NAEARQALPH SYWSPAPY LGNKLPAVGG QLTFTISYDL EEEEEETERV LQMLILEGN DLSISTAQDE VYLHPSEHT NVLLKKEESF TIHGTHFPVR RKEFMTVLAN LKRVLLQITY SFGMDAIFRL SSVNLESAYS YPTDGSIAAA VEVQCQPPGY TGSSCESCW P RRRVNGTIF GGICEPCQCF GHAESCDDVT GECLNCKDHT GGPYCDKCLP GFYGEPTKGT SEDCQPCACP LNIPSNFSP TCHLDRSLGL ICDGCPVGYT GPRCERCAEG YFGQPSVPGG SCQPCQCNDN LDFSIPGSCD SLSGSLICK PGTTGRYCEL CADGYFGDAV DAKNCQPCRC NAGGSFSEVC HSQTGQCECR ANVQGRCDK CKAGTFGLQS ARGCVPCNCN SFGSKSFDCE ESGQCWCQPG VTGKKCDRCA HGYFNFQEGG CTACECSHLG NNCDPKTGR C ICPNTIGEK CSKCAPNTWG HSITTGCKAC NCSTVGSGLDF QCNVNTGQC N CHPKFSGAKC TECSRGHWN Y PRCNLDCDFL PGTDATTCD S ETKKCSQSDQ TGQCTCKVNV EGIHCDRCRP GKFGLDKPNP LGCSscyCFG TTTQCSEAKG LIRTWVTLKA EQTILPLVDE ALQHTTTKGI VFQHP EIVAH MDLMREDLHL EPFYWKLPEQ FEGKKLMAYG GKLYAIYFE AREETGFSTY NPQVIIRGGT PTHARIIVRH MAAPLIGOLT RHEIEMTEKE WKYVGDDPRV HRTVTREDFL DILYDIHYIL IKATYGNFMR QSRISEISME VAEQGRGCTM TPPADLIEK DCPLGYSGLS CEACLPGFYR LRSQPGGRT PPTLGTCTVPC QCNGHSSLCD PETSICQNCQ HHTAGDFCER CALGYYGIVK GLPNDCCQCA CPLISSNNF SPSCVAEGLD DYRCTACPRG YEGQYCERCA PGYTGSPGNP GGSCQCECED PYGSLPVPCD PVTGFTCTRP GATGRKCDGC KHWHAREGWE CVFCGDECTG LLLGDLARLE QMVNSINLTG PLPAPYKMLY GLENMTQELK HLLSPQRAPE RLIIQLAEGNL NTLVTENNEL LTRATKVTD GEQTGQDAER TNTRAKSLGE FIKELARDAE AVNEKAIKLN ETIGTRDEAF ERNLEGLQKE IDQMIKELRR KNLETOKEIA EDELVAEAL LKKVKKLFGE SRGENEEMEK DLREKLADYK NKVDDAWDLL REATDKIREA NRLFAVNQKN MTALEKKKEA VESGKROIEN TLKEGNDILD EANRLADEIN SIIDYVEDIQ TKLPPMSEEL NDKIDDLSEQ IKDKLAEKV

Abbildung 2

Seq.IDNO	Name	Proteinsequenz
		SQAESHAACL NDSSAVLDGI LDEAKNISFN ATAFAKAYSN IKDYIDEAEK VAKEAKDLAH EATKLATGPR GLLKEDAKGC LQKSFRIINE AKKLANDVKE NEDHLNGLKT RIENADARNG DLLRLTNDTL GKLSAIPNDT AAKLQAVKDK ARQANDTAKO VLAQITELHQ NLDGLKKYN KLADSVAKTN AVVKDPSKNK IADADATVK NLEQEARLI DKLKPIKELE DNLKKNISEI KELINQARKQ ANSIKVSVS GGDCIRTYKP EIKKGSYNNI VVNKTAADV NLLFYLGSAK FIDFLAIEMR KGKVSFLWDV GSGVGRVEYP DLTIDDSYWY RIVASRTGRN GTISVRALDG PKASIVPSTH HSTSPPGYTI LDVDANAMLF VGGLTGKLLK ADAVRVITFT GCMGETYFDN KPIGLWNFRE KEGDCKGCTV SPQVEDSEGT ATRDLRPFMS VELTDGHIKV SYDLGSGMAS VVSNQNHNDG KWKSFTLSRI QKQANISIVD IDTNQEENIA TSSSGNNFGL DLKADDKIYF GGLPTLRNLS MKARPEVNK KYSGCLKDIE ISRTYPNLS SPDYVGVTGK CSLENVYTVS FPKPGFVELS VPIDVGTETI NLSFSTKNES GIILLGSGGT PAPPKRKRQ TQQAYYVILL NRGRLVHLS TGARTMRKIV IRPEPNLFHD GREHSHVHER TRGIFTVQVD ENRRYMQNLT VEQPIEVKKL FVGGAPEPFQ PSPLRNIPPF EGCINNLVIN SVPMDFARPV SFKNADIGRC AHQKLEDED GAAPAEIVIQ PEPVPTAPP TPTPVLTHGP CAASEPALL IGSKQFGLSR NSHIAIAFDD TKVKNRLTIE LEVRTEAESG LLFYMAAINH ADFATVQLRN GLPYFSYDLG SGDTHMTIPT KINDGQWHKI KIMRSKQEGI LYVDGASNRT ISPKKADILD VVGMLYVGGI PINYTTRRIG PVTYSIDGCV RNLHMAEAPA DLEQPTSSFH VGTCFANAQR GTYFDGTGFA KAVGGFKVGL DLLVEFEFAT TTTTGVLLGI SSQKMDGMI EMIDEKLMFH VDNAGRFTA VYDAGVPGHL CDGQWHKVT A NKIKHRIELT VDNQVVEAQS PNPASTSADT NDPVFVGFP DDLKQFGLTT SIPFRGCI RS LKLTGTASH WRLILRPWN
8	Elastin	MAGLTAAPR PGVLLLLSI LHPSRPGGVP GAIPGGVPGG VFYPGAGLGA LGGGALPGG KPLKVPVGGI AGAGLGAGLG APPAVTFPGA LVPGGVADAA AAYKAAKAGA GLGGVPGVGG LGVSAGAVVP QPGAGVKPGK VPGVGLPGVY PGGVLPGARF PGVGLPGVP TGAGVKKAP GVGGAFAGIP GVGGFPGQP GVPLGYPIKA PKLPGGYGLP YTTCKLPYGY GPGGVAGAAG KAGYPTGTG GPQAAAAA KAAKFGAGA AGVLPGVGGA

Abbildung 2

Seq.IDNO	Name	Proteinsequenz
9	Alpha-2 type IV collagen	<p> GVPVPGNAIP GIGGIAGVGT PAAAAAATAA AKAAYGAAA GLVPGGPGFG PGVVGVPAG VPGVGVPGAG IPVVPAGAGIP GAAVPGWVSP EAAAKAAAKA AKYGARPGVG VGGIPTYGVG AGGFPFGVG VGGIPGVAGV PSVGGVPGVG GVPGVGISPE AAAAAAKAA KYGVGTPTAAA AKAATAAAQ FALLNLGLV PGVGVAPGVG VAPGVVAPG VGLAPGVGVA PGVGVAPGVG VAPGIGPGV AAAAKSAAKV AKAQLRAAA GLGAGIPGLG VGVVPGGLV GAGVPGGLVG AGVPGFVAV GALAAAKAAK YGAAVPGVLG GLGALGGVGI PGVVGAGPA AAAAAAKAAA KAAQFGLVGA AGLGGLGVGG LGVPGVGLG GIPPAATAA AKYGAAGLGG VLGAGQFPL GGVAARPGFG LSPIFPGGAC LGKACGRKRK </p> <p> MGRDQRAVAG PALRRWLLLG TTVTGFLAQ VLAGVKKFDV PCGGRDCSGG CQCYPEKGGR GQPGVPGPQG YNGPPGLQGF PGLQGRKGDK GERCAPVTG PKGDVGARGV SGFPGDGIP GHFGQGGPRG RPYDGCNGT QGDSGPQGGP GSEFTGPPG PQGPKQKGE PYALPKEERD RYRGEPGPG LVFGQGGPRG PGHVGMGPV GAPRPGPPG PPGPKQQGN RGLGFYGVKG EKGDVGQPGP NGIPSDTLHP IIAPTGVTFH PDQYKGEKGS EGEPIRGIS LKGEIGIMGF PGLRGYPGLS GEKSGPQKG SRGLDYQGP DGRGPKGEA GQPGPPGLPA YSPHPSLAKG ARGDPGFPA QGEPSQGE GDPGLPGPPG LSIGDGQRR GLPGEMGPKG FIGDPGIPAL YGGPPGPDGK RPPGPPGLP GPPGPDGFLF GLKGAKGRAG FGLPGSPGA RPKGWKGA GECKTEGDE AIKGLPGLP PKGFACINGE PGRKGDGDP GQHGLPGFPG LKGVPGNIGA PGPKGAKGDS RTITTKGERG QPGVPGVPM KGDDSPGRD GLDGFPGLPG PPGDGKKEPP GDPGYFGIPG TKGTPGEMGP PGLGLPGLK QRGFPGDAGL PGPPGFLGPP GPAGTPGQID CDTDVKRAVG GDRQEAQPG CIAGPKGLPG LPPGPGPTGA KGLRGIPGFA GADGGPPRG LPGDAGREGF PGPPGFTGPR GSKGAVLPG PDGSPGPIGL PGDPGPPGER GLPGEVLGAQ PGPRGDAGVP GQPLKGLPG DRGPPGFRGS QGMPGMPLK GQPLGPGSG QPGLYGGPGL HGFPGAPQE GPLGLPGIP REGLPDGRD PGDTGAPPV GMKGLSGDRG DAGTGEQGH PGSPGFKGID GMPGTPGLK DRGSPGMDGF QGMPGLKGRP GFPGSKGAG FFGIPGLKGL AGEFGKGRS GDFGPPGPPP </p>

Abbildung 2

Seq.IDNO	Name	Proteinsequenz
		VILPGMKDIK GEKDEGPMG LKYLGAKEI QMPGIPGUS GIPGLPRPG HIKGVKGDIG VPGIPGLPGF PGVAGPPGII GFPGFIGSRG DKGAPGRAGL YGEIGATGDF GDIGDTINLP GRPGLKGERG TTGIPGLKGF FGEKGTEDI GFPGITGVG VQPPGLKQ TGFPGLTGPP GSQGLGRIG LPSGKDDGW PGAPGLPGFP GLRGIRGLHG LPTGKGFPGS PGSDIHGDPG PGPPEGERD PGEANTLPGP VGVPGQKGDQ GAPGERGPPG SPGLQGFPGI TPPSNISGAP GDKGAPGIF LKGYRGPPGP PGSAALPGSK GDTGNPCAPG TPCTKGWAGD SGPQGRPGVF GLPGEKGRG EQGFMGNTGP TGAVGDRGPK GPKGDPGPPG APGTVGAPGI AGIPQKIAIQ PGTVGPQGRR GPPGAPGEIG PGPPEGEPGF RGAPGKAGPQ GRGVSAPVG FRGDEGPIGH QGPIGQEGAP GRPGSPGLPG MGRSVSIGY LLVKHSQTDQ EPMCPVGNMK LWSGYSLLYF EGQEKAHNQD LGLAGSCLAR FSTMPFLYCN PGDVCYYASR NDKSYWLSTT APLPMMPVAE DEIKPYISRC SVCEAPAIAI AVHSQDVSIP HCPAGWRSLW IGYSFLMHTA AGDEGGGQSL VSPGSCLEDF RATPFIECNG GRGTCHYYAN KYSFWLTTIP EQSFQGSPPSA DTLKAGLIRT HISRCQVCWK NL
10	p27	MEASALTSSA VTSVAKVVRV ASGSVVVLPL ARIATVVIGG VVAMAAVPMV LSAMGFTAAG IASSSIAAKM MSAAAIANGG GVASGLVGT LQSLGATGLS GLTKFILGSI GSAIAAVIAR FY
11	Reticulocalbin	MARGGRGRRL GLALGLLAL VLAPRVLRK PTVRKERVVR PDSGLGERPP EDNQSFQYDH EAFLGKEDSK TFDQLTPDES KERLGKIVDR INDGDFVT TEELKTWIKR VQKRYIFDNV AKVWKDYDRD KDDKISWEY KQATYGYILG NPAEFHDSH HHTFKMLPR DERRFKAADL NGDLTATREE FTAFLHPEEF EHMKEIVVLE TLEDIDKNGD GFVDQDEYIA DMFSHEENG EPDWWLSERE QFNEFRDLNK DGKLDKDEIR HWILPDQYDH AQAEARHLVY ESDKNKDEKL TKEILENWN MFVGSQATNY GEDLTKNHDE L
12	Aldehyde dehydrogenase 6	MATANGAVEN GQPDGKPPAL PRPIRNLEVK PTKIFINNEW HESKSGKKFA TCNPSTREQI CEVEEGDKPD VDKAVEAAQV AFQRGSPWRR LDALSRGRL HQLADLVERD RATLALETM DTGKPFHLHAF FIDLEGCIPT

Abbildung 2

Seq.IDNO	Name	Proteinsequenz
13	Gravin	<p> LRYFAGWADK IQGKIPTDD NVVCFTRHEP IGVCGAITPW NFPLMLVWK LAPALCCGNT MVLKPAEQTP LTALYLGSLI KEAGPPPGVV NIVPGFGPTV GAAISSHPQI NKIAFTGSTE VGKLVKEAAS RSNLKRVTLE LGGKNPCIVC ADADLDLAVE CAHQGVFFNQ GQCCTAASRV FVEEQVYSEF VRRSVEYAKK RPYGDPFDVK TEQGPQIDQK QFDKILELIE SGKKEGAKLE CGGSAMEDKG LFIKPTVFSE VIDNMRIAKE EIFGPVQPIL KFKSIEEVK RANSTDYGLT AAVFTKNLDK ALKLASALES GTVWINCYNALYQAAPFGGF KMSGNGRELG EYALAEYTEV KTVIKLGDK NP </p> <p> MGAGSSTEQR SPEQPPGSS TPAEPEPSGG GPSAEAAPDT TADPAIAASD PATKLLQKNG QLSTINGVAE QDELSLQEGD LINGQKALNG QGALNSQEEE EVIVTEVGQR DSEDVSRDS DKEMATKSAV VHDITDDGQE ENRNIEQIPS SESNLEELTQ PTESQANDIG FKKVFKFVGK KFTVKKDKTE KPDTVQLLTV KKEGEAGAAG AGDHQDPSLG AGEAAKSESE PKQSTEKPEE TLKREQSHAE ISPPAESGQA VEECKEEGEE KQSEKPSKSA ESPTSPVTSE TGSTPKKFFT QGWAGWRKKT SFRKPKEDEV EASEKKKEQE PEKVDTEEDG KAEVASEKLT ASEQAHPQEP AESAHEPRLS AEYEKVELPS EEQVSGSQGP SEEKPAPLAT EVFDEKIEVH QEEVVAEVHV STVEERTEEQ KTEVEETAGS VPABELVGMD AEPOEAEPK ELVKKLKECV SGEDPTQGAD LSPDEKVLK PPEGVVSEVE MLSSQERMKV QGSPLKKLFT STGLKKLSGK KQKGRGGGD EESGEHTQVP ADSPDSQEEQ KGESSASSPE EPEEITCLEK GLAEVQQDGE AEEGATSDGE KKREGVTPWA SFKKMVTPEK RVRPSESDEK EDELDKVKSALTSSTESTAS EMQEMKGSV EEPKPEEPKR KVDTSVSWEA LICVGSKKR ARRRSSDEE GGPKAMGGDH QKADGAGKDK ETCTDGILAG SQEHDPGQGS SSPEQAGSPT EGEVSTWES FKRLVTPRKK SKSKLEEKSE DSIAGSGVEH STPDTEPGKE ESWVSIKKFI PGRKKRPPDG KQEQAPVEDA GPTGANEDDS DVPVAVPLSE YDAVEREKME AQQAQKGAEQ PEQKAATEVS KELSEQVHM MAAAADVADGTR AATIEERSP SWISASVTEP LEQVEABEAL LTEEVLREV IAEERPPTVT EPLPENREAR GDTVVSEAEEL TPEAVTAAET AGPLGSEGT EASAAEETTE MVSAVSQLTD. SPDTTEEATP VQVEGGVVD IEEQERRTOE VLQAVAEKVK </p>

Abbildung 2

Seq.IDNO	Name	Proteinsequenz
		<p> EESQLPGTGG PEDVLQPVQR AEAREPEEQE EASGLKKETD VVLKVDAQEA KTEPFTQGV VGQTTPESEFE KAPQVTESE SSELVTTTQQA ETLAGVKSQE MMEQAIPPD SVETPTDSET DGSTPVADFD APGTTQKDEI VEIHEENEVA SGTQSGGTEA EAVPAQKERP PAPSSFVFQE ETKEQSKMED TLEHTDKEVS VETVSILSKT EGTQEQADQYA DEKTKDVFFF EGLEGSIDTG ITVSREKVTE VALKGEETEE AECKKODDALE LQSHAKSPPS PVEREMVVQV EREKTEAEPT HVNEEKLHE TAVTVSEEV KQLLQITVNP IIDGAKEVSS LEGSPPPCLG QEEAVCTKIQ VOSSEASFTL TAAAEKVKL GETANILETG ETLAPAGAHV VLEEKSSSEKN EDFAAHPGED AVPTGPDCA KSTPVIVSAT TKKGLSSDLE GEKTTSLKW SDEVDEQVAC QEVKVSVAIE DLEPENGILE LETKSSKLQV NIIQTAVDQF VRTEETATEM LTSELQTOAH VIKADSQDAG QETEKEGEEP QASAQDETP TSAKEESEST AVGOAHSDIS KDMSEASEKT MTVEVEGSTV NDQOLEEVVL PSEEEGGGAG TKSVPEDDGH ALLAERIEKS LVEPKEDKKG DDVDDPENQN SALADTDASG GLTKESPDN GPQKQEKEDA QEVELQEGKV HSESDKAITP QAQEELOKQE RESAKSELTE S </p>
14	Nidogen	<p> MLASSRIRA AWTRALLPL LLAGPVGCLS RQELFPFGPG QGDLELEDGD DFVSPALELS GALRFYDRSD IDAVVVTNG IATSEPPAK ESHPGLPPT FGAVAPFLAD LDTTDGLGV YREDLSPSI TQRAAECVHR GFPEISFQPS SAVVVTWESV APYQGPSPRD DQKGRNTFQ AVLASSDSSS YAFLYPEDG LQFHTTFSKK ENNVPAVVA FSQGSVGFLW KSNAYNIFA NDRESIENLA KSSNSGQQGV WVEIGSPAT TNGVVPADVI LGTEDGAEYD DEDEDYDLAT TRLGLEDVGT TPFSYKALRR GGADTYSVPS VLSPPRAATE RPLGPPTERT RSFQLAVETF HQHPQVIDV DEVEETGWVF SYNTDSRQTC ANNRHQCSVH AECDYATGF CCSCVAGYTG NGRQCVAEGS PORUNGKVG RIFVGSSQVP IVFENTDLHS YVMNHGRSY TAISTIPETV GYSLPLAPV GGIIGWMFAV EQDGFKNQFS ITGGEFTRQA EVTFVGHGPN LVIKQRFSGI DEHGLTIDT ELEGRVQIP </p>

Abbildung 2

Seq.IDNO	Name	Proteinsequenz
15	Phospholipase Epsilon	<p>FGSSVHIPEY TELYHYSTV ITSSSTREYT VTEPERDGAS PSRIYTYQMR QTITFQECVH DDSRPALPST QQLSVDSVFFV LYNQBEKILR YAFNSIGPV REGSPDALQN PCYIGTHGCD TNAACRPGR TQFTCECSIG FRGDGRTCYD IDECSEQPSV CGSHTICNNH PGTRCECUE GYQFDEGTC VAVVDORPIN YCETGLHNCD IPQRAQCIYT GGSSYTCSCSCL PGFSGDGQAC QDVDECQPSR CHPDAFCYNT PGSFQCCKP GYQGDGFRVCV PGEVEKTRCQ HEREHILGAA GATDPORPIP PGLFVPECEA HGHYAFTQCH GSTGYCWCVD RDGREVEGTR TRPGMTPPCL STVAPPPIHQG PAVPTAVIPL PPGTHLLFAQ TGKIERLPLE GNTMRKTEAK AFLHVPAKVI IGLAFDCVDK MVYWTIDITEP SIGRASLHGG EPTTIIRQDL GSPEGIAVDH LGRNIFWTDN NLDRIEVAKL DGTQRRVLFE TDLVNPGRGIV TDSVRGNLYW TDWNRDNPKI ETSYMDGTNR RILVQDDDLGL PNLGHFDFAFS SQLCWVDAGT NRAECLNPSQ PSRRKALEGL QYPFAVTSYG KNLYFTDWMK NSVVALDLAI SKETDAFQPH KQTRLYGITT ALSQCQPGHN YCSVNNNGGCT HLCLATPGSR TCRCPDNTLG VDCIERK</p> <p>MPSEKKISSA NDCISFMQAG CELKKVRPNS RIYNRFFFLD TDQLALRWEP SKKDLKAKL DISAIKEIRL GKNTETFTNN GLADQICEDC AFSILHGENY ESLLDLVANS A DVANIWVSG L RYLVSRSKQP LDFMEGNQNT PRFMWLKTVF EAADV DNGI MLEDTSVELI KQLNPTLKEA KIRLKFEIQ KSKELTTRV TEEEFCEAFC ELCTRPEVYF LLVQISKKE YLDANDLMLF LEAEQGVTHI TEDICLDIIR RYELSEEGRQ KGFLAIDGFT QYLLSSECDI FDPEQKKVAQ DMTQPLSHYY INASHNTYLI EDQFRGPADI NGYIRALKMG CRSVELDVSD GSDNEPIICN RNNMTTHVSF RSVIEVINKF AFVASEYPLI LCLGNHCSLP QQKVMAQOMK KVFGNKLYTE APLPSESYP SPEKLKRMII VKGKKLPSDP DVLEGEVTD EDEAQSRRM SVDYNGEQKQ IRLCRELSDL VSICKSVQYR DFELSMKSN YMEMCSFSET EASRIANEYP EDFVYNKKF LSRIYPSAMR IDSSNLNPQD FWNCGCQIVA MNFQTGPM DLHTGWFLQN GGCGYVLRPS IMRDEVSYFS ANTKGILPGV SPLALHIKII SGQNFPPKPG ACAKGDVIDP YVCIEIHGIP ADCSEQRKT VQNSDNPIF DETFEFQVNL PELAMIRFVV LDDDDYIGDEF IGQYTIPIPEC LQGYRHRVPL RSFVGDDIMEH VTLFVHIAIT NRSGGGKAQK RSLSVRMGKK</p>

Abbildung 2

Seq.IDNO	Name	Proteinsequenz
		VREYTMLENI GLKTIDIDFK IAVHPLREAI DMRENMQNAI VSIKELCGLP PIASLKQCCL TLSSRLITSD NTPSVSLVMK DSFPYLEPLG AIPDVQKKML TAYDLMIQES RFLIENADTV QEKIVQCQKA GMEFHEELHN LGAKEGLKGR KLNKATESFA WNITVLKGQG DLLKNAKNEA IENMKOIOLA CLSCGLSKAP SSSAEAKSKR SLEAIEEKES SEENGKL

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.